

SENSING OF PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN BY DIFFERENTIAL PULSE ANODIC STRIPPING VOLTAMMETRY OF GOLD NANOPARTICLE – SILVER ENHANCED LABELS

Rika Endara Safitri^a, Ani Mulyasuryani^{a*}, Attasith Parnsubsakul^b, and Patsamon Rijiravanich^c

^aJurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran Malang 65145, Indonesia

^bBiological Engineering Program, Faculty of Engineering, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bang KhunThian, Bangkok 10150, Thailand

^cNational Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Biochemical Engineering and Pilot Plant Research and Development Unit, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bang KhunThian, Bangkok 10150, Thailand

* email : mulyasuryani@yahoo.com

DOI : [10.20961/alchemy.v12i2.1724](https://doi.org/10.20961/alchemy.v12i2.1724)

Received 15 February 2016., Accepted 17 February 2016, Published 01 September 2016

ABSTRAK

Metode deteksi Antigen Spesifik Prostat (ASP) berdasarkan pemotongan peptide dengan menggunakan perak *enhancer* (AgEhn) pada nanopartikel emas (AuNP) sebagai penanda. ASP merupakan serin protease yang dihasilkan secara normal oleh sel jaringan prostat dan sel kanker prostat. ASP secara luas digunakan sebagai biomarker untuk kanker prostat. Aktivitas ASP dideteksi berdasarkan pemotongan peptida yang terikat pada dasar *wellplate* melalui interaksi biotin – avidin. Setelah proses pemotongan, peptida-SH yang terpotong akan terbuang dalam proses pembilasan, peptidayang terpotong pada dasar *wellplate* tidak dapat mengikat nanopartikel emas karena kehilangan gugus tiol (-SH) pada ujung peptida. Sisa peptide-SH yang tidak terpotong akan berikatan dengan AuNP, diikuti dengan reduksi secara autokatalitik pada larutan AgEhn menjadi Ag_(s). Jumlah Ag yang terdapat pada permukaan AuNP ditentukan secara voltametri lucutan anodik (VLA) setelah mengoksidasi Ag_(s) menjadi ion Ag⁺ menggunakan elektroda *screen printed carbon* (SPC). Optimasi dilakukan pada kondisi pengukuran dan kondisi immunoassay, sehingga penentuan PSA pada rentang 1 – 500 ng.mL⁻¹ dihasilkan limit deteksi sebesar 152,204 ng.mL⁻¹ dengan sensitivitas 0,003 μ A/ng.mL⁻¹. Penentuan PSA dengan metode ini telah berhasil dilakukan, namun masih membutuhkan kajian lebih lanjut.

Kata Kunci : antigen spesifik prostat; nanopartikel emas; peptida; voltametri lucutan anodik

ABSTRACT

A sensitive prostate specific antigen (PSA) detection method based on peptide cleavage and silver enhancement of gold nanoparticle (AuNP) has been developed. PSA is serine protease produced by both normal prostate glandular cells and prostate cancer cells. PSA widely used as a biomarker for prostate cancer (PCa). The activity of PSA was

detected by following mechanism: first, some immobilized peptide on the bottom of wellplate was undergo cleaving process via biotin-avidin interaction, leaving short peptide (without thiol group) that could not form a link with gold nanoparticle. Meanwhile, the remaining peptide which not undergo such process could self-assemble with AuNPs, followed by autocatalytic reduction with silver enhancement solutions to silver metal (Ag). The Ag content on AuNPs was determined by differential pulse anodic stripping voltammetry, after oxidation of Ag metal to Ag^+ ions, using screen printed carbon electrode. The measurement conditions and immunoassay components had been optimized in this study. The detection of PSA was successfully carried out by this method with limit detection value of 152.204 ng/mL, but further development is necessary to improve the limit detection value.

Keywords: anodic stripping voltammetry, gold nanoparticle, peptide, prostate specific antigen,

PENDAHULUAN

Metode analisis elektrokimia telah banyak dikembangkan di bidang biokimia. Metode elektrokimia dalam analisis biokimia secara umum dikombinasikan dengan metode *immunoassay* termodifikasi baik pada wadah pengukuran maupun pada elektroda kerja yang digunakan. Penggabungan metode *immunoassay* dengan metode elektrokimia akan menghasilkan pengukuran yang lebih spesifik dengan batas deteksi yang rendah. Pada penelitian ini, analisis biokimia secara elektrokimia dilakukan pada analisis kanker prostate yang berdasarkan konsentrasi Antigen Spesifik Prostat (ASP).

ASP merupakan enzim serin protease berukuran 30 kDa yang diproduksi secara normal oleh sel epitel prostat dan sel kanker prostat. ASP secara umum digunakan sebagai biomarker dari kanker prostat. Beberapa penelitian tentang penentuan ASP secara elektrokimia yang telah dilakukan, antara lain menggunakan elektroda kerja emas dengan penanda ferosen ($Fe(C_2H_5)_2$) (Zhao *et al.*, 2010) yang menghasilkan batas deteksi $0,2 \text{ ng.mL}^{-1}$, dan menggunakan penanda ion ferrosianida ($[Fe(CN)_6]^{4-}$) (Suaifan *et al.*, 2012) menghasilkan batas deteksi hingga 1 pg.mL^{-1} . Pada penelitian ini, penentuan ASP menggunakan metode voltametri denyut diferensial lucutan anodic (VDDLA) dengan penanda nanopartikel emas. Metode VDDLA memiliki sensitifitas hingga konsentrasi 10^{-9} (ppb).

Beberapa analisis biokimia yang telah dilakukan dengan metode voltametri denyut diferensial (VDD) menggunakan emas sebagai penanda, berupa nanopartikel maupun sebagai elektroda kerja telah banyak digunakan, karena emas dapat berinteraksi dengan gugus tiol (SH) pada peptida (Ambrosi, 2007 dan Al-Akraa *et al.*, 2013). Analisis senyawa biokimia secara VDD menggunakan emas, antara lain dalam penentuan α – fetoprotein

(Liu *et al.*, 2010); Immunoglobulin G / IgG (Cui *et al.*, 2008; Selvaraju *et al.*, 2008); Thrombin (Zheng *et al.*, 2007); Hepatitis B / HBsAg (Liang *et al.*, 2005); oligonukleotida DNA (Cai *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2007); serta antigen Karsinoembrionik (Wu *et al.*, 2006).

Penentuan ASP pada penelitian ini menggunakan metode VDD dengan elektroda karbon dan penanda nanopartikel emas (AuNP). Untuk meningkatkan kuantifikasi pada pengukuran secara VDD, penanda AuNP dilapisi dengan senyawa *enhancer* berupa perak *enhancer* (AgEhn). AgEhn mudah tereduksi secara enzimatik pada permukaan Au, sehingga penentuan ASP berdasarkan konsentrasi perak (Ag) yang terukur sebagai ion Ag (Ag^+). Konsentrasi Ag yang tereduksi pada permukaan AuNP akan dipengaruhi oleh waktu deposisi AgEhn (Morphew *et al.*, 2008).

AgEhn mudah larut dalam pelarut asam (seperti asam nitrat) membentuk ion perak (Ag^+) sehingga mudah diukur secara VDD. Pada penelitian ini, metode VDD dirangkaikan dengan metode prekonsentrasi voltametri lucutan anodik (VLA) untuk meningkatkan sensitivitas pengukuran hingga ppb. Penentuan ASP secara tidak langsung dengan memodifikasi metode *immunoassay* pada *wellplate* dan pengukuran secara voltametri denyut diferensial lucutan anodik (VDDLA) didasarkan pada jumlah substrat yang tidak terpotong oleh ASP serta mengikat penanda AuNP - AgEhn. AgEhn yang terikat pada substrat dioksidasi menjadi ion Ag^+ yang terukur secara VDDLA menghasilkan arus ion perak ($\text{Arus Ag}/I_{\text{Ag}}$), sedangkan jumlah substrat yang tidak bereaksi dengan ASP ditentukan dari selisih arus puncak Ag ($I_{\text{p PSA } 0 \text{ ng.mL}^{-1}} - I_{\text{p PSA } 100 \text{ ng.mL}^{-1}}$). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kondisi pengukuran (potensial deposisi, waktu deposisi, dan laju pembacaan) larutan AgNO_3 (Ag^+) dengan metode VDDLA dan mempelajari pengaruh komponen *immunoassay* terhadap penentuan ASP (konsentrasi avidin, konsentrasi BSA, waktu inkubasi peptida, dan waktu deposisi AgEhn) dengan metode VDDLA menggunakan penanda AuNP-AgEhn. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi salah satu pengembangan dalam penentuan ASP secara voltametri dengan menggunakan nanopartikel emas – perak *enhancer* (AuNP - AgEhn) sebagai penanda dalam modifikasi *immunoassay* yang selektif dan sensitif.

METODE PENELITIAN

Bahan

Avidin dari putih telur, Tris(2-karboksietil)fosfin hidroklorida (TCEP) 0,5 M, Larutan Perak *Enhancer* A, dan Larutan Perak *Enhancer* B berasal dari SIGMA Life

Science. *Bovine serum albumin* (BSA) fraksi V pH 7,0 diproduksi oleh PAA The Cell Culture Company (Austria). Peptida dengan rantai MPA – HSSKLQ – Lis – *spacer* – biotin diproduksi oleh Proteogenix SAS (France). Antigen spesifik prostat (ASP) terbuat dari air mani manusia diproduksi oleh Merck EMD Milipore (USA). Nanopartikel Emas terbuat dari HAuCl_4 5 mM dari MERCK. Sodium nitrat (NaNO_3), sodium asetat (NaCH_3COO), asam asetat (CH_3COOH) 100% ($\rho = 1,050 \text{ Kg.L}^{-1}$), sodium karbonat (Na_2CO_3), sodium hidrogen karbonat (NaHCO_3), di-sodium hidrogen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sodium dihidrogen fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), asam nitrat (HNO_3) 69%, hidrogen klorida (HCl) 37%, dan tris-hidrogenmetilaminometan (TRIS) diproduksi oleh MERCK. Semua larutan disiapkan dengan air MiliQ. Elektroda *Screen-printed carbon* (SPCE) C-Ag/AgCl (BI 1302) diproduksi oleh Quasense.co.Ltd (Karbon sebagai elektroda kerja; Ag/AgCl sebagai elektroda acuan dan elektroda pembanding), 96 *wellplate* maxisorp (442404) diproduksi oleh Thermo Scientific NUNC plate (Denmark).

Alat

Peralatan elektroanalisis yang digunakan adalah Autolab ® PGSTAT 12 serial no. AUT 71393 dengan perangkat lunak GPES versi 4.9.005. Peralatan lain yang digunakan adalah pipet mikro, *autoclave*, dan *mixing block* MB – 102 produksi BIOER.

Prosedur Kerja

a. Optimasi Pengukuran AgNO_3 dengan Metode VDDLA

Optimasi pengukuran AgNO_3 dengan metode VDDLA dilakukan adalah potensial deposisi dari potensial -0,1 sampai -0,5 V; waktu deposisi dari 100 sampai 500 detik (tanpa proses pengadukan); dan laju perubahan potensial dari 0,01 sampai 0,1 V.s^{-1} . Variabel tetap pada optimasi pengukuran adalah pembacaan potensial -0,3 sampai 0,7 V; step potensial 0,0063 V dan amplitudo adalah 0,05 V. Larutan yang digunakan pada prosedur optimasi ini yaitu 50 μM AgNO_3 dalam 50% HNO_3 sebanyak 50 μL dan buffer asetat 0,1 M pH 5,5 sebanyak 200 μL .

b. Modifikasi *Immunoassay* untuk Deteksi ASP Menggunakan Penanda Nanopartikel Emas – Perak *Enhancer*

Avidin dengan konsentrasi 1 sampai 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sebanyak 50 μL dimasukkan ke dalam *wellplate* dan diinkubasi selama 12 jam pada suhu 4 °C. Setelah proses inkubasi, *wellplate* dicuci dengan menggunakan 200 μL 0,01 M buffer fosfat pH 7,4 ditambah 0,05

% (v/v) tween 20 (BPT) sebanyak 2 kali dan 200 μL 0,01 M buffer fosfat pH 7,4 (BP) sebanyak 3 kali.

Wellplate Avidin ditambahkan 200 μL *Bovine serum albumin* (BSA) dengan konsentrasi 0 sampai 4 % (m/v) dalam BP (kondisi baru) dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C menggunakan shaker *wellplate*. Setelah proses inkubasi selesai, *wellplate* dicuci dengan menggunakan 200 μL BPT sebanyak 2 kali dan 200 μL BP sebanyak 3 kali.

Wellplate Avidin - BSA ditambahkan 50 μL Peptida (peptida-TCEP) (kondisi baru) dan diinkubasi selama 15 sampai 90 menit pada suhu 37 °C menggunakan *shaker wellplate*. Setelah proses inkubasi selesai, *wellplate* dicuci dengan menggunakan 180 μL BPT ditambah 20 μL TCEP 10 mM sebanyak 2 kali dan 180 μL BP ditambah 20 μL TCEP 10 mM sebanyak 3 kali.

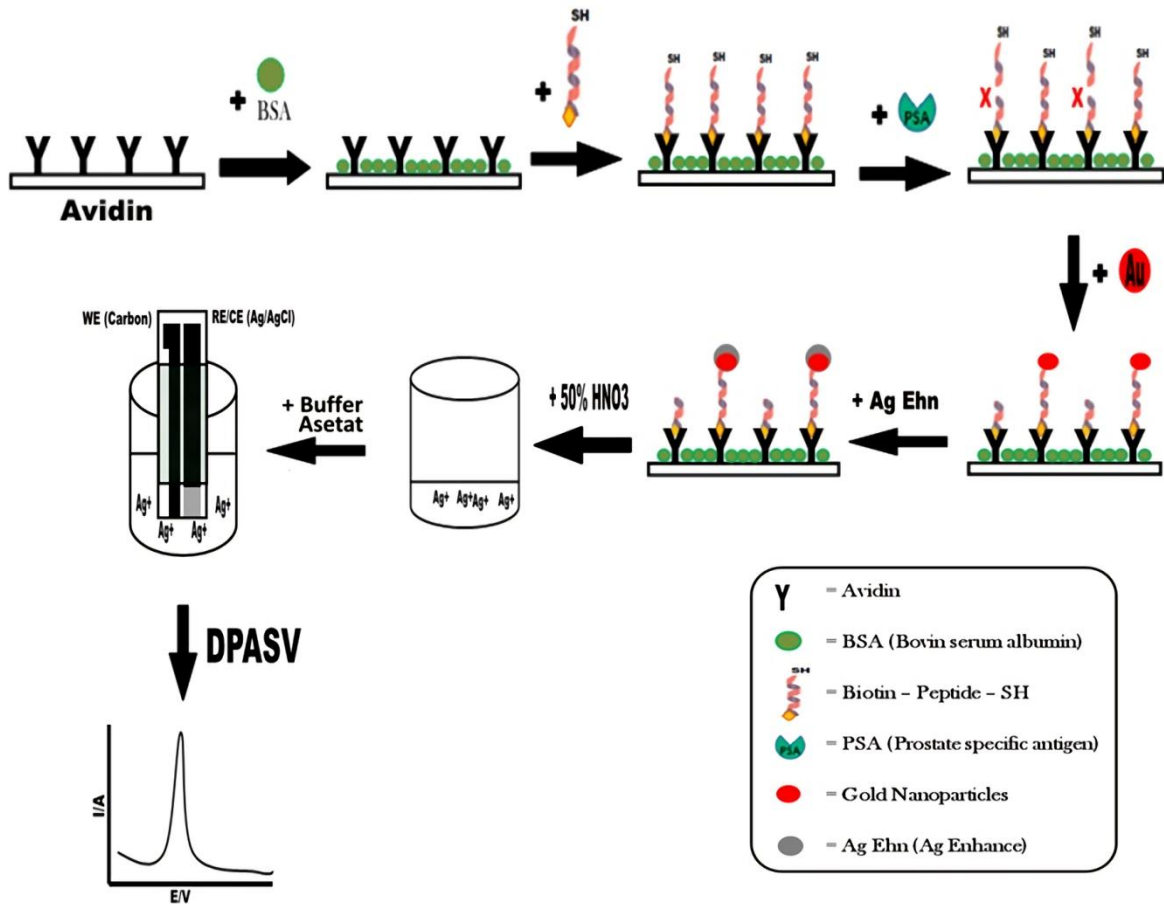
Wellplate Avidin - BSA - peptida ditambahkan 50 μL ASP dengan konsentrasi 0 – 500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ dalam BP dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C menggunakan *shaker wellplate*. Setelah proses inkubasi selesai, *wellplate* dicuci dengan menggunakan 180 μL BPT ditambah 20 μL TCEP 10 mM sebanyak 2 kali, 180 μL BP ditambah 20 μL TCEP 10 mM sebanyak 3 kali, dan 180 μL TRIS 0,05 M ditambah 20 μL TCEP 10 mM sebanyak 2 kali.

Wellplate ditambahkan 50 μL larutan nanopartikel emas + TRIS (1:1 (v/v)) dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang (25 °C). *Wellplate* dicuci dengan 200 μL 0,5 M NaNO_3 , 0,2 % (v/v) tween 20 dan 0,01 % (m/v) natrium dodesil sulfat (NTS) sebanyak 3 kali dan 200 μL NaNO_3 0,5 M sebanyak 2 kali. *Wellplate* dengan nanopartikel emas ditambahkan 50 μL perak *enhanced* (larutan A : larutan B = 1:1 (v/v)) dan direduksi selama 1 sampai 10 menit pada suhu ruang (25 °C) dalam ruang gelap. *Wellplate* dicuci dengan 200 μL *miliq water* sebanyak 5 kali. *Wellplate* siap diukur dengan metoda VDDLA menggunakan elektroda SPE C-Ag/AgCl. Proses modifikasi *immunoassay* dapat dilihat pada Gambar 1.

c. Pengukuran dengan metode VDDLA

Wellplate termodifikasi ditambahkan 50 μL HNO_3 50 % (v/v) dan 200 μL buffer asetat 0,1 M pH 5,5, kemudian diaduk selama 2 menit. Elektroda SPE C-Ag/AgCl dicuci dengan air deionisasi dan dikeringkan menggunakan gas N_2 . Elektroda SPE C-Ag/AgCl dirangkai pada *wellplate* dan alat potensiostat dimana C (karbon) sebagai elektroda kerja dan Ag/AgCl sebagai elektroda *counter* dan elektroda pembanding. Kondisi kerja yang diterapkan pada pengukuran dengan metoda VDDLA yaitu, potensial deposisi optimum,

waktu deposisi optimum (tanpa proses *stirring* / pengadukan), potensial pembacaan -0,3 sampai 0,7 V, laju perubahan potensial optimum, dan amplitude adalah 0,05 V.

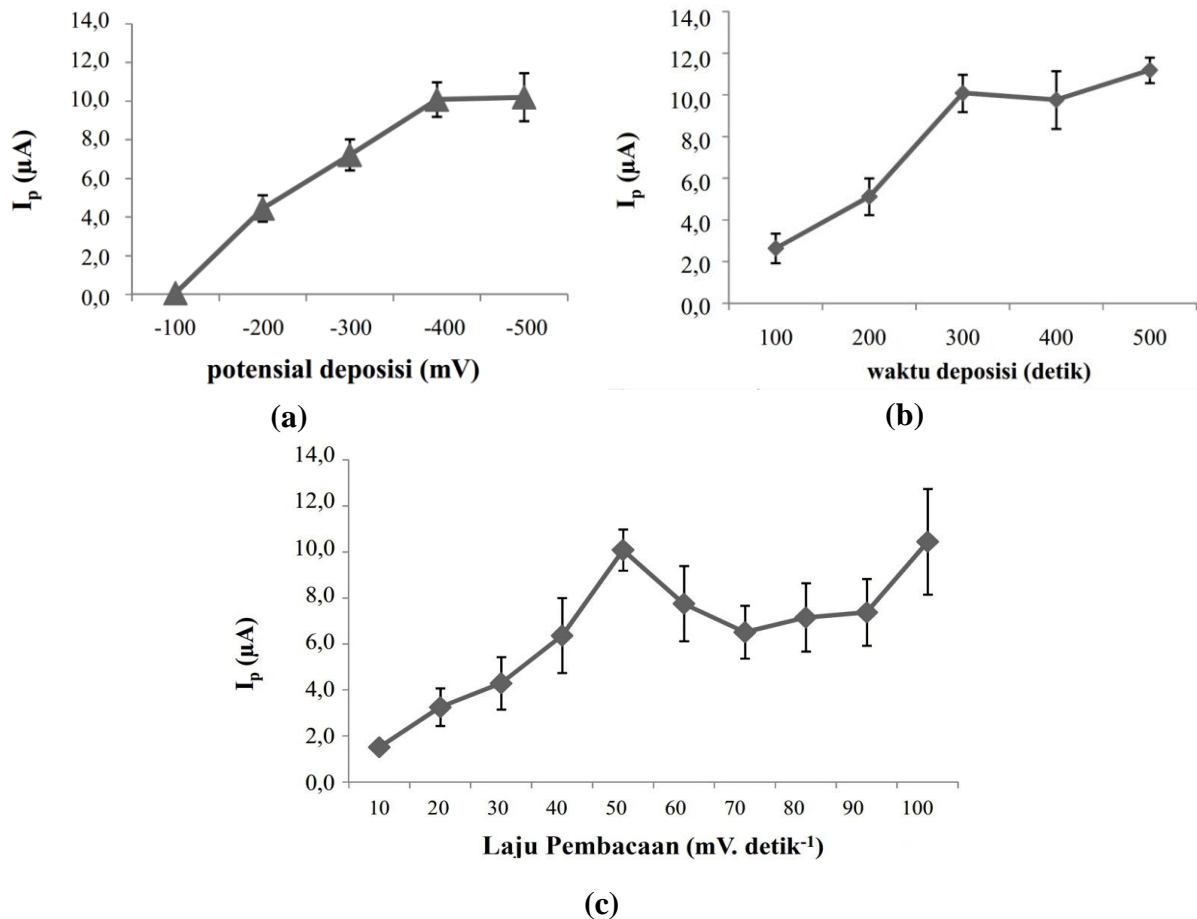


Gambar 1. Modifikasi *immunoassay* untuk deteksi ASP dengan metode VDDL.

PEMBAHASAN

Optimasi Pengukuran AgNO₃ dengan Menggunakan Metode VDDL

Optimasi pengukuran AgNO₃ menggunakan metode VDDL dilakukan terhadap potensial deposisi, waktu deposisi, dan laju pembacaan. Pada optimasi potensial deposisi terjadi peningkatan arus yang dihasilkan sebanding dengan peningkatan potensial yang diberikan hingga mencapai titik jenuh -0,4 V dan telah mencapai nilai optimal. Optimasi pengukuran yang kedua adalah optimasi waktu deposisi dan didapatkan nilai optimal pada waktu 300 detik. Optimasi pengukuran yang terakhir adalah optimasi laju pembacaan dan didapatkan optimal pada laju pembacaan 0,05 V.s⁻¹. Hasil pengukuran optimasi dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Optimasi pengukuran AgNO_3 dengan metode VDDL : (a) Potensial Deposisi, (b) Waktu Deposisi, dan (c) Laju Pembacaan (*scan rate*).

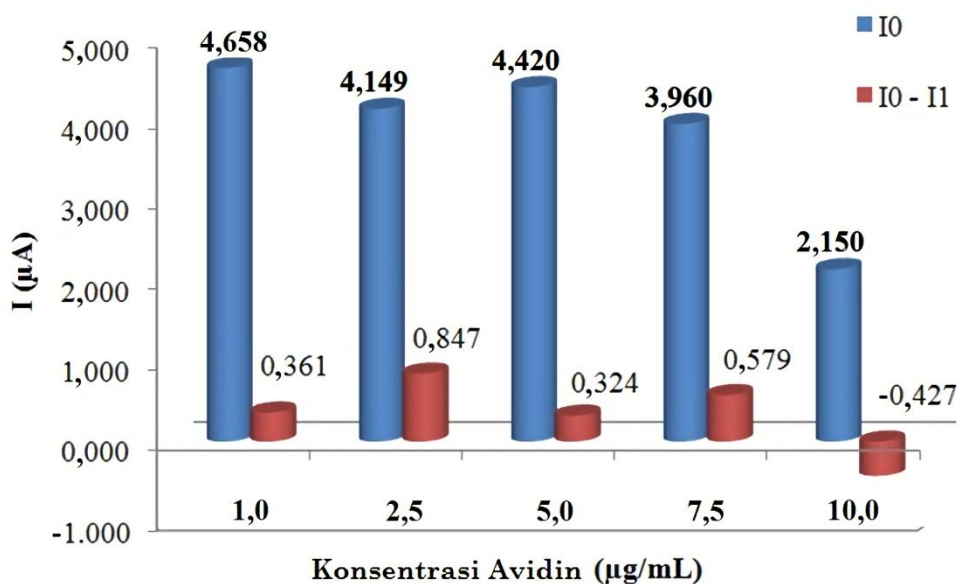
Modifikasi *Immunoassay* untuk Deteksi ASP dengan metode VDDL

a. Pengaruh Konsentrasi Avidin

Avidin merupakan suatu protein yang dapat terikat kuat pada dasar *wellplate* dengan permukaan *maxisorp* (hidrofilik). Avidin memiliki 4 sisi aktif yang dapat mengikat biotin dengan ikatan hidrogen. Konsentrasi avidin yang digunakan akan mempengaruhi jumlah biotin - peptida yang terikat. Pada penelitian ini, konsentrasi avidin yang dipelajari dari $1 - 10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, dimana konsentrasi avidin yang dibutuhkan berdasar pada perhitungan luas daerah dasar *wellplate* terhadap ukuran maksimal dari avidin adalah $2,6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Pada konsentrasi ASP $0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, peningkatan konsentrasi avidin akan meningkatkan jumlah mol biotin-peptida yang mengikat AuNP - AgEhn, sehingga akan meningkatkan arus puncak (I_p). Namun pada hasil penelitian ini (Gambar 3), peningkatan konsentrasi avidin berbanding terbalik dengan arus puncak yang terukur (pada konsentrasi ASP $0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$). Arus puncak yang terukur pada konsentrasi avidin $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ lebih tinggi dibandingkan pada konsentrasi avidin yang lain. Penurunan arus puncak pada peningkatan

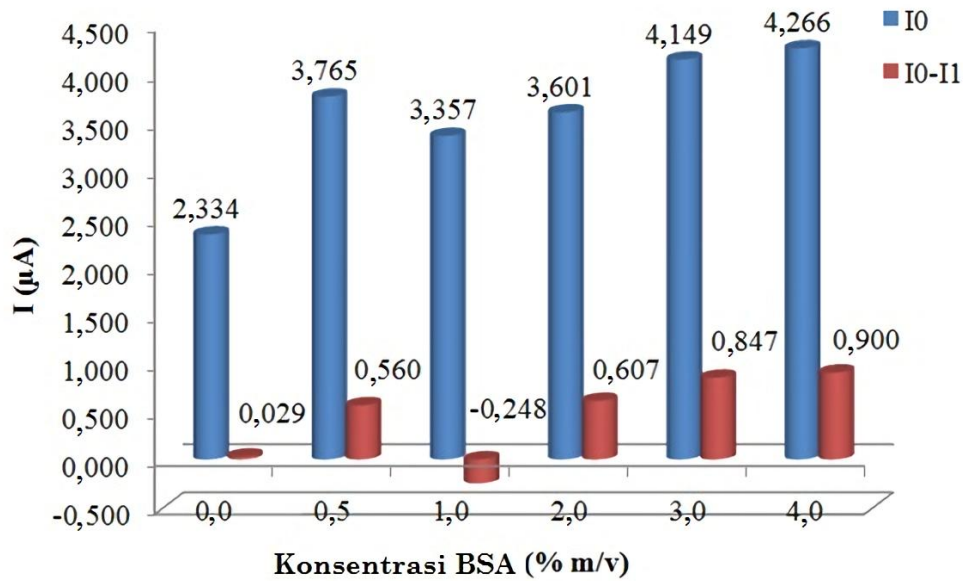
konsentrasi avidin ini disebabkan kerapatan susunan antibodi avidin pada dasar *wellplate* yang mengganggu pengikatan biotin-peptida untuk mengisi 4 sisi aktif avidin yang berdampak pada penurunan jumlah penanda AuNP - AgEhn yang terikat sehingga menurunkan arus puncak yang terukur. Penurunan arus puncak juga terjadi pada selisih arus Ag ($I_0 - I_1$), yang diakibatkan oleh penurunan aktivitas ASP terhadap biotin - peptida (substrat) dan pengikatan penanda AuNp - AgEhn yang tidak maksimal. Berdasarkan hasil penelitian pada Gambar 3, peneliti menentukan konsentrasi avidin mencapai optimum pada konsentrasi $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, dengan selisih arus Ag ($I_0 - I_1$) terukur maksimum yaitu $0,847 \pm 0,538 \mu\text{A}$.



Gambar 3. Pengaruh konsentrasi avidin terhadap arus Ag yang terukur (I_0 untuk 0 ng.mL^{-1} ASP dan I_1 untuk 100 ng.mL^{-1} ASP).

b. Pengaruh Konsentrasi BSA

Bovine serum albumin (BSA) (titik isoelektrik 4,7) pada metode *immunoassay* ini digunakan sebagai protein pendukung yang berfungsi untuk mengisi dasar *wellplate* yang tidak mengikat avidin (kosong). Pada penelitian ini, penggunaan BSA selain sebagai senyawa penghalang juga dapat meningkatkan stabilitas peptide dan enzim, namun tidak mengganggu proses *immunoassay*. Berdasarkan perhitungan ukuran BSA terhadap perkiraan ruang kosong pada *wellplate* yang tidak terisi oleh antibodi avidin, konsentrasi BSA yang dibutuhkan berkisar $1,5 \%$ (m.v^{-1}).



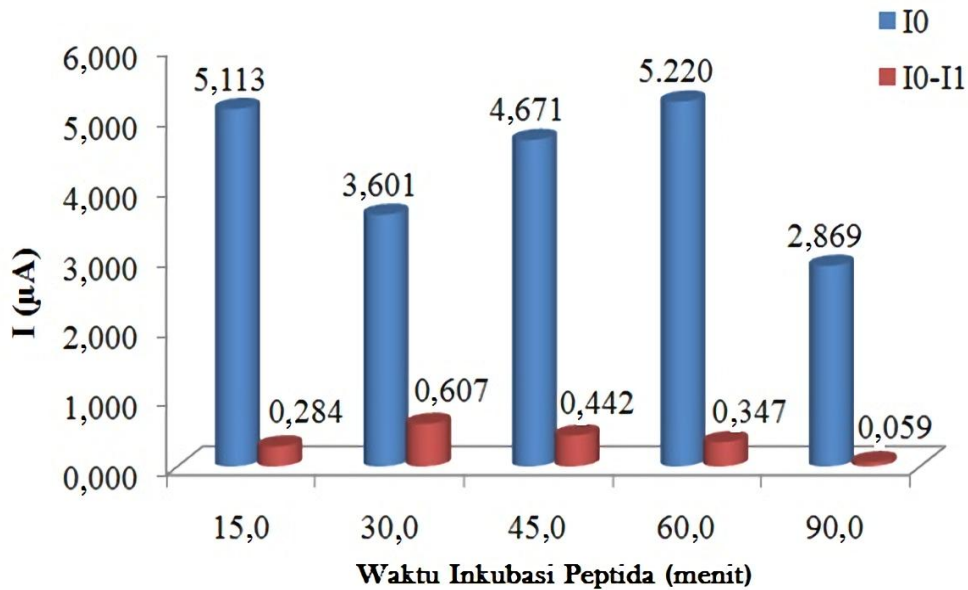
Gambar 4. Pengaruh konsentrasi BSA terhadap arus Ag yang terukur (I_0 untuk 0 ng.mL^{-1} ASP dan I_1 untuk 100 ng.mL^{-1} ASP).

Berdasarkan Gambar 4, peningkatan konsentrasi BSA berbanding lurus dengan arus Ag yang terukur (pada konsentrasi ASP 0 ng.mL^{-1}). Hal ini dikarenakan BSA dapat berfungsi untuk menstabilkan protein yang terikat, sehingga biotin - peptida akan mengikat penanda AuNP - AgEhn dengan stabil dan spesifik. Kondisi peptida yang stabil terlihat pula pada nilai selisih arus Ag ($I_0 - I_1$) yang mengalami peningkatan seiring dengan peningkatan konsentrasi BSA. Peningkatan konsentrasi BSA sebanding dengan dengan selisih arus ($I_0 - I_1$), namun nilai yang dihasilkan semakin tidak stabil sehingga mengakibatkan nilai standar deviasi yang tinggi. Pada penelitian ini, konsentrasi BSA mencapai nilai selisih arus yang stabil dengan nilai standar deviasi yang kecil adalah 2 % dengan nilai selisih arus Ag ($I_0 - I_1$) $0,607 \pm 0,156 \mu\text{A}$.

c. Pengaruh Waktu Inkubasi Peptida

Peptida yang digunakan sebagai substrat memiliki gugus tiol (-SH) yang berasal dari Mpa. Menurut penelitian Al-Akraa *et al.* (2013), gugus tiol mudah mengikat nanopartikel emas sebagai penanda secara kovalen. Waktu inkubasi peptida tergantung pada laju reaksi biotin – peptida untuk berikatan hidrogen dengan sisi – sisi aktif avidin. Peningkatan waktu inkubasi peptida akan mempengaruhi jumlah peptida yang terikat pada avidin, namun lama waktu inkubasi juga dapat menyebabkan ikatan peptida mengalami denaturasi dan gugus tiol pada ujung biotin – peptida mengalami oksidasi sehingga membentuk ikatan kovalen disulfida (S-S). Ikatan disulfida yang terbentuk akan

mengganggu proses pengikatan penanda AuNP – AgEhn sehingga menurunkan arus puncak yang terukur.

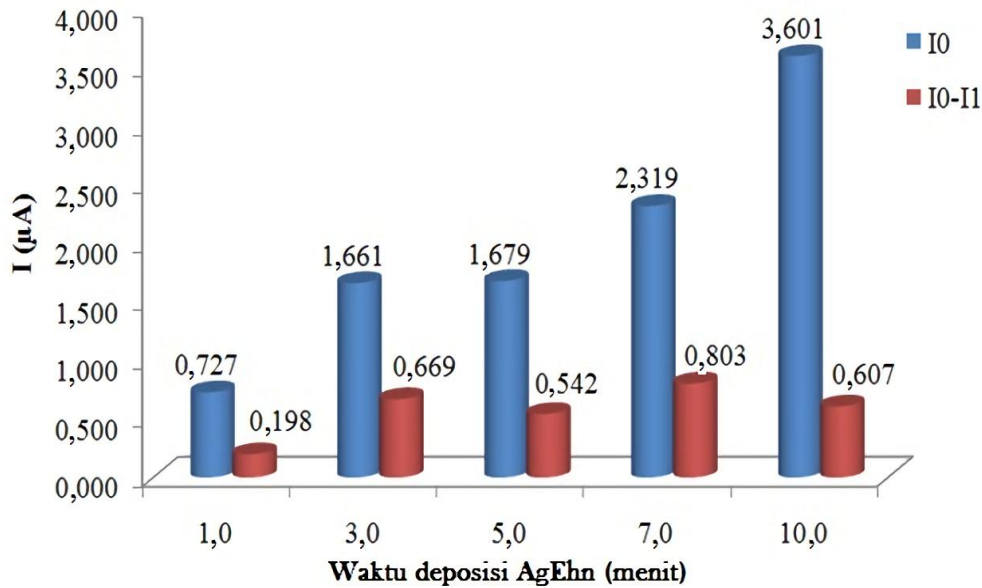


Gambar 5. Pengaruh waktu inkubasi peptida terhadap arus Ag yang terukur (I_0 untuk 0 ng.mL^{-1} ASP dan I_1 untuk 100 ng.mL^{-1} ASP).

Pada penelitian ini, waktu inkubasi berbanding lurus dengan arus Ag yang terukur (pada konsentrasi ASP 0 ng.mL^{-1}) (Gambar 5). Hal ini disebabkan waktu inkubasi peptida sebanding dengan jumlah substrat yang terikat pada sisi - sisi aktif avidin, sehingga mempengaruhi peningkatan arus Ag yang dihasilkan. Pada waktu inkubasi 60 menit, arus puncak (I_p) yang terukur memiliki nilai tertinggi (pada konsentrasi ASP 0 µg.mL^{-1}) yang mengindikasikan biotin – peptida telah maksimum berikatan dengan sisi–sisi aktif avidin. Namun selisih arus tertinggi terjadi pada waktu inkubasi peptide 30 menit. Pada penelitian ini, waktu inkubasi optimum peptida pada penentuan ASP dengan metode ini adalah 30 menit dengan nilai arus yang terukur hanya $3,601 \text{ µA}$ dan nilai selisih arus Ag ($I_0 - I_1$) terukur maksimum dengan standar deviasi (SD) kecil yaitu $0,607 \pm 0,156 \text{ µA}$.

d. Pengaruh Waktu Deposisi Perak *Enhancer*

Perak *enhancer* (AgEhn) adalah senyawa garam perak yang direduksi menggunakan senyawa pereduksi hidroquinon dan dapat terdeposisi pada permukaan emas. Waktu deposisi AgEhn akan mempengaruhi jumlah Ag yang tereduksi. Menurut Morphew *et al.* (2008), bahwa semakin lama waktu deposisi AgEhn pada permukaan nanopartikel emas maka akan semakin banyak ion Ag yang terdeposisi pada permukaan. Jumlah Ag yang terdeposisi pada permukaan nanopartikel emas berbanding lurus dengan arus Ag yang terbaca.



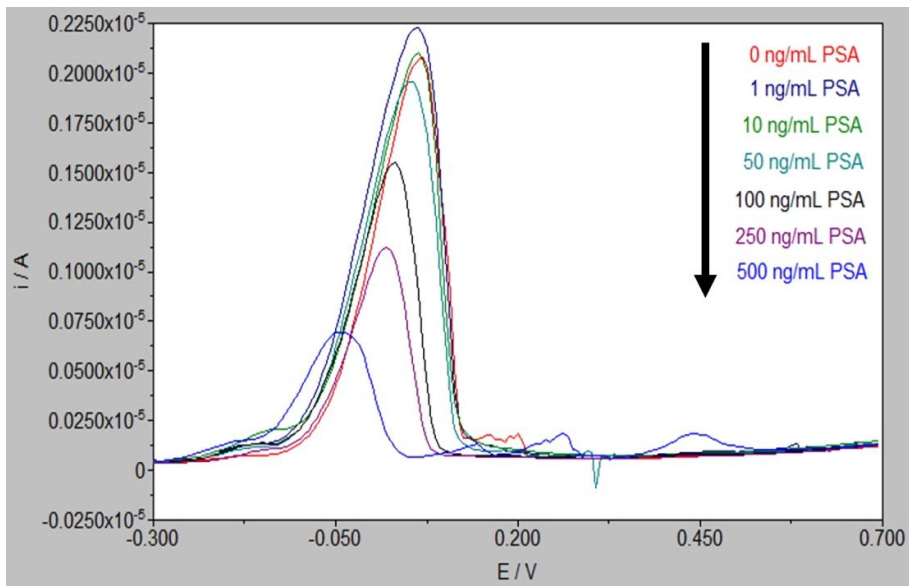
Gambar 6. Pengaruh waktu deposisi AgEhn terhadap arus Ag yang terukur (I_0 untuk 0 ng.mL^{-1} ASP dan I_1 untuk 100 ng.mL^{-1} ASP)

Pada penelitian ini, AgEhn digunakan sebagai penanda yang akan dideteksi dengan metode VDDL. Pengaruh waktu deposisi AgEhn dilakukan pada 1 - 10 menit dalam ruang gelap. Berdasarkan Gambar 6, waktu deposisi AgEhn berbanding lurus dengan arus Ag yang terukur (pada konsentrasi AuNP tetap dan konsentrasi ASP 0 ng.mL^{-1}). Hal ini disebabkan jumlah ion Ag^+ yang terdeposisi pada permukaan emas menjadi $\text{Ag}_{(s)}$ semakin meningkat. Waktu deposisi optimum AgEhn untuk penentuan ASP dengan metode ini adalah 3 menit, dimana jumlah Ag yang terdeposisi dapat memberikan nilai selisih arus Ag ($I_0 - I_1$) yang cukup tinggi dengan standar deviasi (SD) yang rendah yaitu $0,669 \pm 0,124$ μA .

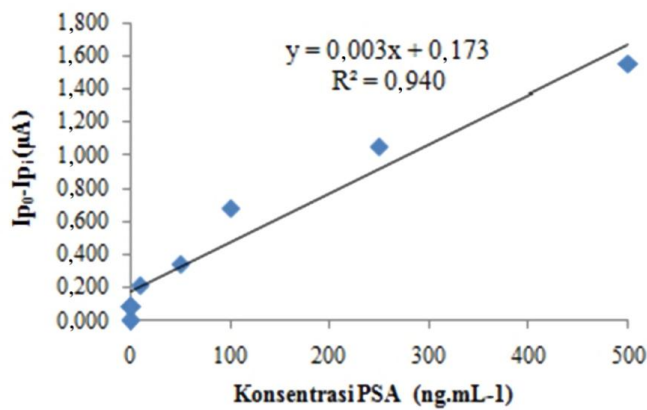
Penentuan ASP dengan Metode VDDL

Penentuan ASP dengan menggunakan AuNP – AgEhn sebagai senyawa penanda dilakukan pada konsentrasi PSA 0; 1; 10; 50; 100; 250; dan 500 ng.mL^{-1} . ASP bekerja secara enzimatis memotong peptida, sehingga peningkatan konsentrasi ASP akan menurunkan jumlah substrat yang dapat mengikat AuNP - AgEhn akibat adanya pemotongan rantai peptida yang memiliki gugus tiol (-SH). Untuk mengetahui jumlah peptida yang terpotong oleh ASP maka dapat ditentukan dengan menghitung selisih arus Ag ($I_{p0} - I_{pi}$). Kondisi yang digunakan pada proses *immunoassay* untuk penentuan ASP ini adalah konsentrasi avidin 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, konsentrasi BSA 2 %, waktu inkubasi substrat (biotin - peptida) 30 menit, dan waktu deposisi AgEhn 3 menit. Berdasarkan Gambar 7(a), peningkatan konsentrasi ASP menyebabkan penurunan arus Ag yang disebabkan oleh

peningkatan jumlah peptida yang terpotong sehingga jumlah AuNP - AgEhn yang terikat juga semakin sedikit. Kurva konsentrasi ASP terhadap selisih arus puncak (Gambar 7 (b)) pada rentang konsentrasi ASP 1 - 500 ng.mL⁻¹ memberikan persamaan linier $I (\mu A) = 0,003 [ASP] + 0,173$ dengan regresi linier = 0,940, sehingga didapatkan sensitivitas penentuan ASP dengan metode ini adalah 0,003 $\mu A/ng.mL^{-1}$. Penentuan batas deteksi (*Limit of detection* / LoD) pada penelitian ini adalah 3 kali dari simpangan baku dibagi dengan kemiringan pada kurva konsentrasi ASP terhadap selisih arus puncak, sehingga didapatkan batas deteksi sebesar 152,204 ng.mL⁻¹.



(a)



(b)

Gambar 7. (a) Voltamogram VDDLA pada konsentrasi ASP 1 sampai 500 ng/mL terhadap Arus Ag (E vs Ag/AgCl), **(b)** Kurva kalibrasi konsentrasi PSA 1 sampai 500 ng/mL terhadap selisih Arus Ag

KESIMPULAN

Penentuan ASP dengan metode VDDLA dapat dilakukan dengan baik dan memberikan batas deteksi $152,204 \text{ ng.mL}^{-1}$. Nilai batas deteksi yang diberikan masih melebihi batas normal konsentrasi ASP dalam darah manusia yaitu 4 ng.mL^{-1} , sehingga diperlukan pengembangan metode dengan menggunakan jenis elektroda kerja selain SPE karbon/Ag/AgCl dan metode pengukuran voltametri yang lebih selektif dan sensitif.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didukung oleh proyek National Research University dari Thailand, King Mongkut's University of Technology Thonburi – Thailand, dan Universitas Brawijaya Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Akraa, I. M., Mohammad, A. M., El-Deab, M. S., and El-Anadouli, B. E., 2013. Self-Assembling of Gold Nanoparticles Array for Electro-Sensing Applications. *International Journal of Electrochemical Science* 8, 458 – 466.
- Ambrosi, Adriano, 2007. *The Application of Nanomaterials in Electrochemical Sensors and Biosensors*. School of Chemical Sciences, Dublin City University. Ireland.
- Cai, H., Wang, Y., He, P., and Fang, Y., 2002. Electrochemical Detection of DNA Hybridization Based on Silver – Enhanced Gold Nanoparticle Label. *Analytical Chimica Acta* 469 (2), 165 – 172.
- Cui, R., Huang, H., Yin, Z., Gao, D., and Zhu, J. J., 2008. Horseradish Peroxidase functionalized Gold Nanoparticle Label for Amplified Immunoanalysis Based on Gold Nanoparticles / Carbon Nanotubes Hybrids Modified Biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 23 (11), 1666 – 1673.
- Denmeade, S. R., Lou, W., Lövgren, J., Malm, J., Lilja, H., and Isaacs, J. T., 1997. Specific and Efficient Peptida Substrates for Assaying The Proteolytic Activity of Prostate Specific Antigen. *Cancer Research* 57, 4924-4930.
- Kang, J., Li, X., Wu, G., Wang, Z., and Lu, X., 2007. A New Scheme of Hybridization Based on The Au_{nano} – DNA Modified Glassy Carbon Electrode. *Analytical Biochemistry* 364 (2), 165 – 170.
- Lei Zhu, 2009. *Development of Novel Assays for Measuring Different Molecular Forms of Prostate Specific Antigen*. Department of Clinical Chemistry. University of Helsinki. Finland.
- Liang, R., Qui, J., and Cai, P., 2005. A Novel Amperometric Immunosensor Based on Threedimensional Sol – Gel Network and Nanoparticle Self - Assemble Technique. *Analytical Chimica Acta* 534 (2), 223 – 229.

- Liu, X., Wu, H., Zheng, Y., Wu, Z., Jiang, J., Shen, G., and Yu, R., 2010. A Sensitive Electrochemical Immunosensor for α -Fetoprotein Detection with Colloidal Gold-Based Dextrin Enzyme Complex Amplification. *Electroanalysis* 22, 244 – 250.
- Lu, L. P., Wang, S. Q., and Lin, X. Q., 2004. Fabrication of Layer – by – Layer Deposited Multilayer Films Containing DNA and Gold Nanoparticle for Norepinephrine Biosensor. *Analytica Chimica Acta* 519 (2) 161 – 166.
- Morphew, M., He, W., Bjorkman, P.J., and McIntosh, J.R., 2008. Silver Enhancement of Nanogold Particles during Freeze Substitution for Electron Microscopy. *Journal of Microscopy* 230, 263-267.
- Niemelä, P., Lövgren, J., Karp, M., Lilja, H., and Pettersson, K., 2002. Sensitive and Specific Enzymatic Assay for the Determination of Precursor Forms of Prostate specific Antigen after an Activation Step. *Clinical Chemistry* 48 (8), 1257-1264.
- Selvaraju, T., Das J., Han S. W., and Yang H., 2008. Ultrasensitive Electrochemical Immunosensing Using Magnetic Beads and Gold Nanocatalysts. *Biosensors and Bioelectronics* 23 (7), 932 – 938.
- Suaifan, G. A. R. Y., Esseghaier, C., Ng, A., and Zourob, M., 2012. Wash-Less and Highly Sensitive Assay for Prostate Specific Antigen Detection. *Analyst* 137, 5614 – 5619.
- Wu, C. C., Pan, T. M., Wu, C. S., Yen L. C., Chuang, C. K., Pang, S. T., Yang, Y. S., and Ko, F. H., 2012. Label-free Detection of Prostate Specific Antigen Using a Silicon Nanobelt Field-effect Transistor. *International Journal of Electrochemical Science* 7, 4432-4442.
- Wu, L., Chen, J., Du, D., and Ju, H., 2006. Electrochemical Immunoassay for CA125 Based on Cellulose Acetate Stabilized Antigen/Colloidal Gold Nanoparticles Membrane. *Electrochimica Acta*. 51 (7), 1208 – 1214.
- Zhao, N., He, Y., Mao, X., Sun, Y., Zhang, X., Li, C.Z., Lin, Y., and Liu, G., 2010. Electrochemical Assay of Active Prostate Specific Antigen (PSA) Using Ferrocene-Functionalized Peptide Probes. *Electrochemistry Communications* 12, 471-474.
- Zheng, J., Feng, W., Lin, L., Zhang, F., Cheng, G., He, P., and Fang, Y., 2007. A New Amplification Strategy for Ultrasensitive Electrochemical Aptasensor with Network-Like Thiocyanuric Acid–Gold Nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics* 23 (3), 341 – 347.
- Zhu, L., Leinonen, J., Zhang, W. M., Finne, P., and Stenman U.H., 2003. Dual-Label Immunoassay for Simultaneous Measurement of Prostate Specific Antigen (PSA) - 1 -Antichymotrypsin Complex Together with Free or Total PSA. *Clinical Chemistry* 49 (1), 97-103.